

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-302539

(P2001-302539A)

(43)公開日 平成13年10月31日(2001.10.31)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
A 61 K 38/17		A 23 K 1/16	302 J 2 B 15 U
A 23 K 1/16	302		303 F 4 B 018
	303		304 C 4 C 084
	304	1/175	4 C 086
1/175		A 23 L 1/30	B
	審査請求 有 請求項の数 9 OL (全 5 頁)		最終頁に統く

(21)出願番号 特願2000-125226(P2000-125226)

(71)出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72)発明者 山口 正義

静岡県静岡市瀬名川1丁目15番5号

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(22)出願日 平成12年4月26日(2000.4.26)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 骨強化剤、骨強化用食品及び骨強化用飼料組成物

(57)【要約】

【課題】本発明は骨粗鬆症の発症や進行に伴う骨密度の低下を防ぐための新たな骨強化剤、骨強化用食品組成物及び骨強化用飼料組成物を提供する。

【解決手段】骨の健全性に不可欠なカルシウムの吸収を促進し骨強化効果を示すことが知られているCPPと、骨組織に直接作用し、骨吸収を抑制し、かつ骨形成を促進することにより骨強化効果を発現するゲニステインとを併用した場合に、単に両者の作用が加算された効果が発現するのではなく、相乗的な効果が現れることを見いだし本発明を完成した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】カゼインホスホベブチド及びゲニステインを有効成分として含有することを特徴とする骨強化剤

【請求項2】有効成分として更にミネラルを含有することを特徴とする請求項1記載の骨強化剤

【請求項3】ミネラルがカルシウム、マグネシウム、リンの一つ以上を含むものである請求項2記載の骨強化剤

【請求項4】カゼインホスホベブチド及びゲニステインを有効成分として含有することを特徴とする骨強化用食品組成物

【請求項5】有効成分として更にミネラルを含有することを特徴とする請求項4記載の骨強化用食品組成物

【請求項6】ミネラルがカルシウム、マグネシウム、リンの一つ以上を含むものである請求項5記載の骨強化用食品組成物

【請求項7】カゼインホスホベブチド及びゲニステインを有効成分として含有することを特徴とする骨強化用飼料組成物

【請求項8】有効成分として更にミネラルを含有することを特徴とする請求項7記載の骨強化用飼料組成物

【請求項9】ミネラルがカルシウム、マグネシウム、リンの一つ以上を含むものである請求項8記載の骨強化用飼料組成物

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カゼインホスホベブチド及びゲニステインを有効成分として含有することを特徴とする骨強化剤、骨強化用食品、及び骨強化用飼料組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】高齢化社会を迎えた我が国において、骨粗鬆症等に起因する骨折で寝たきり状態に陥る高齢者が増加している。そのため骨粗鬆症を予防することは極めて重要な課題である。このような背景において、数々の治療薬の開発が行われている一方で、食事や健康食品等に含まれる食品成分による骨粗鬆症の予防についても益々研究が盛んになりつつある。また家畜・家禽においては、人間と同様に骨を強化することにより健全性を保つことは経済性を上げる意味で重要である。一方ペットにおいては丈夫な骨格をつくるために人間より多くのカルシウムを必要とすると言われており、骨強化を考慮に入れたペットフードが求められている。

【0003】骨強化を考える場合、骨の主成分であり健全な骨の維持に必要なカルシウムの効率的な吸収を促進することが一つのポイントである。牛乳中のタンパク質から調製されるカゼインホスホベブチド（以下CPPと略記する。）にはカルシウムの吸収を促進する作用があり、既に数々の食品・飼料原料として実用化されている。また飲食品又は飼料にCPPを添加して、骨密度や骨中カルシウム量の保持効果を認めた発明としては特開

平10-248525があるが、大豆イソフラボンあるいはその一成分であるゲニステインとの相乗作用を証明したものではない。

【0004】一方、ゲニステインはマメ科イソフラボン類の一つであり、最近、骨塩量を増加する作用を有することが明らかにされている。ゲニステインは、同じ大豆等に含有されるイソフラボンであるダイゼインと比べると骨塩溶解を引き起こす破骨細胞の機能を阻害する効果が10倍強いことが明らかにされている（Biol. Pharm. Bu

10., 22: 805-809, 1999）。更に、老齢ラットの大脳骨骨幹端部組織を用いた培養系において、破骨細胞の骨吸収を直接阻害し（Biochem. Pharmacol., 55:71-76, 1998）、骨芽細胞による骨塩量の増進、細胞増殖の指標となるDNA量の増加を引き起こす（Res. Exp. Med., 197: 101-107, 1997）ことが知られている。また更に4週齢のラットにおいて骨強化に対して亜鉛との相乗作用が認められている（J. Bone Miner. Metab., 18: 77-83, 2000）。

## 【0005】

20 【発明が解決しようとする課題】本発明は骨粗鬆症の発症や進行に伴う骨密度の低下を防ぐための新たな骨強化剤、骨強化用食品組成物及び骨強化用飼料組成物を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、骨の健全性に不可欠なカルシウムの吸収を促進し骨強化効果を示すことが知られるCPPと、骨組織に直接作用し、骨吸収を抑制し、かつ骨形成を促進することにより骨強化効果を発現するゲニステインとを併用した場合に、単に両者の作用が加算された効果が発現するのではなく、相乗的な効果が現れることを見いだし本発明を完成するに至った。

30 【0007】すなわち、本発明はカゼインホスホベブチド及びゲニステインを有効成分として含有することを特徴とする骨強化剤、骨強化用食品組成物及び骨強化用飼料組成物に関する。また、本発明はカゼインホスホベブチド及びゲニステインに加えて有効成分として更にミネラルを含有することを特徴とする骨強化剤、骨強化用食品組成物及び骨強化用飼料組成物に関する。更に、上記ミネラルがカルシウム、マグネシウム、リンの一つ以上を含むものである骨強化剤、骨強化用食品組成物及び骨強化用飼料組成物に関する。

## 【0008】

【発明の実施の形態】本発明の骨強化剤、骨強化用食品及び骨強化用飼料組成物は、CPPとゲニステインを含有するものである。本発明において用いられるCPPは、カゼインの加水分解物であってカルシウムを可溶化する活性を有するホスホベブチドである。ゲニステインの供給源としては、特に限定されるものではないが、大豆をはじめとするマメ科植物由來のものを用いることが

出来る。

【0009】本発明の骨強化剤、骨強化用食品及び骨強化用飼料組成物には、ミネラルを配合しても良い。この場合のミネラルとは、骨に含まれる3種類の主要元素、すなわちカルシウム、マグネシウム、及びリンを指すが、ナトリウムやカリウム、あるいはその他の栄養的必須元素である鉄、亜鉛、銅、クロム、セレン、マンガン、モリブデンを配合しても問題はない。

【0010】本発明の骨強化剤、骨強化用食品及び骨強化用飼料組成物のゲニステインに対するCPPの比率は重量比で500～5,000倍、カルシウムに対するCPPの比率は重量比で0.08倍以上、特に好ましくは0.2～2倍、マグネシウムに対するCPPの比率は重量比で0.01倍以上、特に好ましくは0.05～1倍、リンに対するCPPの比率は重量比で0.04～4倍である。

#### 【0011】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0012】1) 本実施例における材料及び方法は以下の通りである。

#### 試験動物

日本SLC(浜松)から得たウィスター系雌(コンベンション)、生後4週齢のラットを用いた。

#### 【0013】動物試験群

1. 対照群：基本飼料(ラット用固形飼料、オリエンタル酵母製MF)

2. CPP群：基本飼料+CPP(40mg/100g体重)

3. ゲニステイン群：基本飼料+ゲニステイン(50μg/100g体重)

4. CPP+ゲニステイン群：基本飼料+CPP(40mg/100g体重)+ゲニステイン(50μg/100g体重)

基本飼料には、炭水化物57.4%、カルシウム1.15%、マグネシウム0.25%、リン0.88%を含む。CPPは明治製菓製のCPP-III(カゼインホスホベブチド含量85%)を用い、ゲニステインは大豆から抽出・高純度精製された試薬(Sigma社製)を10%エタノール溶液に溶かして用いた。

#### 【0014】飼育及び投与方法

1群5匹の動物を室温25°C、湿度55%の恒温恒湿下、基本飼料で飼育し、対照群には精製蒸留水を1ml/100g体重、他の群にはCPP及び/又はゲニステインを上記の量いずれも胃ゾンデで1日1回14日間経口投与した。最終投与の24時間後にラットをと殺し、大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨は骨幹部(皮質骨)と骨幹端部(海綿骨)に分け、骨成分の測定に使用した。

#### 【0015】骨組織中カルシウム量の測定

大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織を0.25Mショ糖溶液中で軽く洗浄し、100°Cで約6時間乾燥器中で乾燥した。その乾燥重量を測定した後、試験管に入れ、濃硝酸3mlを添加して、24時間120°Cで分解した。これを試料

液として、カルシウム量を原子吸光光度計で定量した。カルシウム量は、骨乾燥重量1g当りのmgとして表示した。

#### 【0016】骨アルカリ性フォスファターゼ活性の測定

大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織を冷0.25Mショ糖溶液で洗浄後、冷6.5mMバルビタール緩衝液(pH7.4)3ml中で破碎し、60秒間の超音波処理をした。更に3,000回転/分で5分間遠心処理し、その上清画分を粗酵素溶液として用いた。骨アルカリ性フォルファターゼ活性は、

- 10 Walter及びSchuttの方法(Bergmyer H.U. (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 1-2, Academic Press, New York, pp.856-860, 1965)に従って測定した。酵素反応は、基質としてp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを含む0.1Mジエタノールアミン塩酸緩衝液(pH9.8)2mlに酵素溶液0.05mlを加えることにより反応を開始させた。反応は、37°C、30分間インキュベーションすることにより行った。0.05N NaOH 10mlを加えることにより、反応を停止させ、遊離したp-ニトロフェノール量(nmol)を、使用した酵素タンパク質量(mg)当りで表示した。タンパク質の濃度はLowryらの方法(J. Biol. Chem., 193: 265-273, 1951)に準じて測定した。

#### 【0017】骨組織中のデオキシリボ核酸(DNA)量の測定

大腿骨の骨幹部組織と骨幹端部組織を冷0.25Mショ糖溶液で洗浄し、水分除去後、湿重量を測定した。これを0.1N NaOH 4.0ml中で破碎し、4°C、24時間振盪抽出した。その後、3,000回転/分で5分間遠心処理し、その上清画分をDNA測定用試料とした。DNA量の測定は、Cerottiの方法(J. Biol. Chem., 214: 39-77, 1955)に従って行った。試料2.0mlに濃塩酸1.0ml及び0.04%インドール溶液1.0mlを加え、試験管にアルミキャップをかぶせ、沸騰水浴中で10分間加熱した後、氷中で急冷することによって反応を停止させた。クロロホルム4.0mlで3～4分間の抽出を数回繰り返し、分光光度計(490 nm)でDNA量を測定した。DNA量は、骨組織湿重量(g)当りで計算した。

#### 【0018】統計処理法

各々の測定値の有意差検定は、Student's t-testを用いて行った。危険率5%以下のものを有意差ありとした。

#### 【0019】2) 結果

##### 体重

飼育終了後の体重は、対照群111.4±2.7 g、CPP群112.2±0.9 g、ゲニステイン群123.8±1.2 g、CPP+ゲニステイン群119.0±1.9 gであり、ゲニステイン群( $p<0.01$ )、CPP+ゲニステイン群( $p<0.05$ )で対照群に比べて有意に高い体重を示した。

##### 【0020】大腿骨の乾燥重量

大腿骨の乾燥重量の結果を表1に示した。対照群に比べてCPP群で1.09倍、ゲニステイン群1.12倍、CPP+ゲニステイン1.18倍にいずれも有意に増加しており、そ

5

の増加作用は相加的であった。

【0021】

\*【表1】

\*

6

表1 大腿骨の乾燥重量

投与群	大腿骨乾燥重量 (mg)
対照	204.9±2.60
C P P	222.5±3.10*
ゲニステイン	230.4±1.20*
C P P + ゲニステイン	241.6±1.82*, #

\*p&lt;0.01 (対照と比較して)

#p&lt;0.01 (C P Pあるいはゲニステインの単独効果と比較して)

【0022】大腿骨カルシウム量

骨塩量の指標となる大腿骨のカルシウム量を表2に示した。骨幹部では対照群に比べてC P P群で1.09倍、ゲニステイン群1.12倍、C P P+ゲニステイン1.21倍にいずれも有意に増加しており、その増加作用は相加的であった。一方骨幹端部では対照群に比べてC P P群で1.04

\*倍、ゲニステイン群1.07倍、C P P+ゲニステイン1.17倍にいずれも有意に増加しており、その増加作用は相乗的であった。

【0023】

【表2】

表2 大腿骨のカルシウム量

投与群	骨カルシウム (mg/g 乾燥重量)	
	骨幹部	骨幹端部
対照	201.6±3.18	190.3±4.89
C P P	219.2±3.95**	197.1±3.65
ゲニステイン	225.1±3.23**	204.1±3.56*
C P P + ゲニステイン	243.5±2.63**, #	222.3±4.19**, #

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 (対照と比較して)

#p&lt;0.01 (C P Pあるいはゲニステインの単独効果と比較して)

【0024】大腿骨アルカリ性フォルファターゼ活性

大腿骨における増骨に関与する骨代謝マーカーであるアルカリ性フォルファターゼ活性を表3に示した。骨幹部では対照群に比べてC P P群で1.02倍、ゲニステイン群1.04倍、C P P+ゲニステイン群1.12倍にいずれも有意に増加しており、その増加作用は相乗的であった。一方骨★

★幹端部では対照群に比べてC P P群で1.02倍、ゲニステイン群1.04倍、C P P+ゲニステイン1.18倍にいずれも有意に増加しており、その増加作用は相乗的であった。

【0025】

【表3】

表3 大腿骨アルカリ性フォルファターゼ

投与群	アルカリ性フォルファターゼ活性 (μ mol/min/mg protein)	
	骨幹部	骨幹端部
対照	1.737±0.021	1.784±0.017
C P P	1.779±0.014	1.818±0.013
ゲニステイン	1.809±0.014*	1.853±0.017**
C P P + ゲニステイン	1.942±0.017**, #	2.105±0.017**, #

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 (対照と比較して)

#p&lt;0.01 (C P Pあるいはゲニステインの単独効果と比較して)

【0026】大腿骨DNA量

大腿骨における細胞増殖の指標となるDNA量を表4に示した。骨幹部では対照群に比べてC P P群で1.05倍、ゲニステイン群1.06倍、C P P+ゲニステイン1.12倍にいずれも有意に増加しており、その増加作用は相加的であった。一方骨幹端部では対照群に比べてC P P群で1.02

50 倍、ゲニステイン群1.09倍、C P P+ゲニステイン1.23倍にいずれも有意に増加しており、その増加作用は相乗的であった。

【0027】

【表4】

表4 大腿骨のDNA量

投与群	DNA量 (mg/g 骨湿重量)	
	骨幹部	骨幹端部
対照	1.788±0.031	2.653±0.041
C P P	1.886±0.037	2.701±0.047
ゲニステイン	1.895±0.013*	2.894±0.034*
C P P + ゲニステイン	2.002±0.018*, #	3.276±0.044*, #

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 (対照と比較して)

#p&lt;0.01 (C P Pあるいはゲニステインの単独効果と比較して)

## 【0028】

【発明の効果】本発明によりC P P (40 mg/100 g体重)とゲニステイン (50 μg/100 g体重)の2週間の経口投与はラット大腿骨の骨成分(骨重量、骨カルシウム、アルカリ性フォルファターゼ、DNA)の有意な増加を引き起こすことが認められた。その効果は大腿骨の骨構造の差異、すなわち皮質骨(骨幹部)あるいは海綿骨(骨幹端部)のいずれにおいても発現された。C P Pとゲニステインの同時経口投与は、骨幹端部組織におけるカルシウム量、アルカリ性フォルファターゼ活性及びDN\*20

\* A群のいずれにおいても、C P Pあるいはゲニステインの単独効果よりも強い増加効果を発現し、その効果は相乗的であった。また骨幹部組織においては、C P Pとゲニステインの同時投与はアルカリ性フォルファターゼ活性の相乗的上昇効果をもたらした。このようにC P Pとゲニステインとは骨代謝調節機能に対して相乗的効果を有することは、C P P又はゲニステインを単独に投与した結果からでは予期せぬ効果であり、その意義は極めて大きい。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マーク (参考)
A 2 3 L	1/30	A 2 3 L	1/304
	1/304	A 6 1 K	31/4375
A 6 1 K	31/4375		33/06
	33/06		33/42
	33/42	A 6 1 P	3/00 1 7 1
A 6 1 P	3/00 1 7 1		3/02
	3/02		19/00
	19/00	A 6 1 K	37/16

F ターム(参考) 2B150 AA01 AA05 AA06 AB10 DB21  
DC23 DD31 DH04 DH05 DH14  
DH35  
4B018 MD01 MD03 MD04 MD21 MD42  
MD58 MD71 ME05  
4C084 AA02 CA38 MA52 NA05 ZA961  
ZA962 ZC751 ZC752  
4C086 AA01 AA02 CB09 HA04 HA19  
MA02 MA03 MA04 MA52 NA05  
ZA96 ZC75